

## **Sirkulasi virus Avian influenza H5N1 Tahun 2010 : Virus genetic drift mirip A/Ck/West Java/Pwt-Wij/2006 ditemukan di beberapa kabupaten di Sumatra dan Jawa**

**NLP Indi Dharmayanti, Atik Ratnawati, Dyah Ayu Hewajuli, & Risa Indriani**

Balai Besar Penelitian Veteriner, JL RE Martadinata 30, Bogor

Email : nlpdharmayanti@yahoo.com

### **ABSTRACT**

**The avian influenza H5N1 virus circulation in 2010 : Genetic Drift Like Virus A/Chicken/West Java/Pwt-Wij/2006 was found in several districts of Sumatra and Java.** Until 2011, the H5N1 subtype of AI virus is still circulating in many parts of Indonesia. The discovery of the AI viruses which have undergone genetic drift since 2006 until now requires serious attention from the government in terms of AI disease control, the surveillance and monitoring of virus circulation and execution of genetic mapping to determine the genetic character of the AI virus at the molecular level, especially on the surface of glycoproteins (HA and NA protein). This information is needed to determine the diversity and character of the AI virus in Indonesia. Genetic data are used to evaluate the strategy to control AI in Indonesia, such as vaccination and the vaccine seed used and determine the extent of AI virus mutation in Indonesia has been mutated. This study conducted by monitoring of the AI virus circulation throughout 2010. The methods used were AI virus isolation, RT-PCR, sequencing of genes coding for viral surface and the prediction of three-dimensional analysis to determine the location of virus mutation. The results of this study showed that most of the AI virus subtype H5N1, which was isolated during the year 2010, showed similar mutations to the genetic drift virus in 2006, A/Ck/West Java/Pwt-Wij/2006. The viruses were characterized by the presence of 18-19 amino acid substitutions at the level of the HA protein. On the NA protein level, there is a single mutation which was buried in the NA molecule. This mutation probably did not influence for NA activity. Genetic mapping of AI virus subtype H5N1 in 2010 showed that the viral genetic drift as the mutan virus A/Ck/West Java/Pwt-Wij/2006 have circulated not only in West Java alone but has been found on the island of Sumatra, Banten, West Java and East Jawa.

**Keywords:** Circulation, avian influenza H5N1 virus, genetic drift

### **PENDAHULUAN**

Virus avian influenza sub tipe H5N1 di Indonesia pertama kali diidentifikasi pada tahun 2003 (Wiyono *et al.* 2004; Dharmayanti *et al.* 2004). Analisis genetik menunjukkan bahwa sebagian

besar virus influenza H5N1 dari unggas dan manusia di Asia termasuk Indonesia dalam golongan genotipe Z, serupa dengan virus yang pertama kali diidentifikasi pada unggas di Cina Selatan (Guan *et al.* 2004; Li *et al.* 2004; Puthavathana *et al.* 2005; WHO 2005).

Sejak akhir tahun 2003, virus ini bersirkulasi di Indonesia, dan telah mengalami evolusi yang menyebabkan virus AI sub tipe H5N1 membentuk varian-varian baru (Dharmayanti *et al.* 2005a, Dharmayanti *et al.* 2005b; Dharmayanti *et al.* 2008; Dharmayanti dan Darminto 2009; Dharmayanti *et al.* 2010).

Data pemetaan genetika virus AI tahun 2003-2008 memperlihatkan bahwa virus Indonesia terbagi menjadi 3 kelompok; kelompok genetika pertama adalah kelompok virus AI yang masih mirip dengan progeni virus tahun 2003, Kelompok kedua adalah virus *antigenic drift* tahun 2006 dan beberapa virus turunannya dan kelompok ketiga adalah virus ekstensif *antigenic drift* tahun 2007-2008 (Dharmayanti 2009). Data ini memperlihatkan bahwa virus Indonesia telah dan sedang terus bermutasi. Pemerintah pada tahun 2009 memutuskan untuk menggunakan seed A/ West Java/Pwt-Wij/06 sebagai salah satu vaksin H5N1 yang direkomendasikan untuk digunakan pada unggas di Indonesia. Dharmayanti (2009) mengidentifikasi bahwa virus A/West Java/Pwt-Wij/06 secara genetis sudah berbeda dengan virus AI *antigenic drift* yang diisolasi pada tahun 2008. Uji tantangan yang telah dilakukan (Dharmayanti 2009; Indriani & Dharmayanti 2009, data tidak dipublikasikan) memperlihatkan bahwa seed vaksin A/West Java/Pwt-Wij/06 tidak mampu memproteksi terhadap virus *antigenic drift* tahun 2008. Hal ini membuktikan bahwa virus AI di Indonesia telah bermutasi, sehingga

vaksin yang digunakan perlu disesuaikan dengan virus yang sedang bersirkulasi di lapang. Hal ini juga membuktikan juga pentingnya peran surveilans dan penelitian molekuler virus untuk mengetahui karakter virus AI terkini yang sedang bersirkulasi.

Dalam penelitian ini penelitian molekuler dilakukan untuk mengetahui karakter genetik virus AI yang sedang bersirkulasi di Indonesia terkini dan dianalisis kemungkinan terjadinya mutasi *antigenic drift* pada virus AI yang diisolasi pada tahun 2010.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Identifikasi Virus AI

Sampel swab dan organ dikoleksi dari peternakan ayam yang sebagian besar melakukan vaksinasi AI. Sampel diproses sesuai dengan prosedur OIE (2000). Virus diidentifikasi dengan *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dengan primer Matrix untuk mengidentifikasi virus influenza tipe A (Fouchier *et al.* 2000), primer spesifik H5 (Lee *et al.* 2001) dan N1 (Wright *et al.* 1995) untuk mengidentifikasi sub tipe H5N1. Reaksi RT-PCR dilakukan dengan menggunakan reagen *Superscript one III Step RT-PCR System* (Invitrogen) sesuai dengan instruksi penggunaan dengan mesin Thermal Cycler Applied Biosystem (9700). Sampel yang positif mengandung virus AI H5N1 dengan metode RT-PCR selanjutnya dikultur pada telur *specific pathogen free* (SPF) berembrio umur 9-11 hari (PT Biofarma). Untuk memastikan bahwa virus yang tumbuh

dalam cairan alantois tersebut merupakan virus AI subtipe H5N1, cairan alantois positif virus avian influenza subtipe H5N1 hasil panen dari telur SPF berembrio yang telah diinfeksi sampel dari lapang, dikonfirmasi dengan mengujinya kembali RT-PCR seperti pada proses diatas

### **Analisis Sekuensing DNA**

Fragmen DNA hasil amplifikasi dipurifikasi dengan *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen). Fragmen DNA hasil amplifikasi gen HA dan NA yang telah dipurifikasi selanjutnya disekuensing dengan menggunakan primer sesuai dengan disain Hoffman *et al.* (2001); Lee *et al.* (2001) dan Dharmayanti (2009) dengan mesin *Genetix Analyzer* (ABI-3130 PE Applied Biosystems). Editing sekuen, *multiple alignment* dan homologi virus dilakukan dengan program Bioedit versi 7 dan Finch TV, sedangkan pohon filogenetik dihasilkan dengan menggunakan *neighbor-joining bootstrap analysis* (1,000 replicates) dengan menggunakan *Tamura-Nei algorithm* dalam program MEGA, versi 4 (<http://www.megasoftware.net>) (Dharmayanti 2009).

### **Konstruksi Visualisasi Protein tiga dimensi (3D)**

Hasil translasi nukleotida yang merupakan sekuen protein yang akan dianalisa dijadikan dalam bentuk format fasta. Data sekuen protein kemudian dimasukkan dalam BLAST *search* untuk penentuan tingkat homologi protein yang akan dijadikan cetakan (dalam hal ini HA

dan NA) dengan Protein Data Bank (PDB *file*) yang mempunyai homologi tertinggi. Penjejeran sekuen dengan cetakan dibuat model 3D dengan menggunakan *DS Modeller* dan *DS Standalone* dari *Discovery Studio for Modeling and Simulation* (Accelrys Discovery Studio 2.1) (Dharmayanti 2009).

## **HASIL**

### **Identifikasi Virus AI**

Sebelas virus yang digunakan dalam penelitian ini (Tabel 1) teridentifikasi sebagai virus AI subtipe H5N1. Dalam penelitian ini dianalisis virus AI subtipe H5N1 yang diisolasi dari unggas di kabupaten Tangerang, Sukabumi, Bandung, Cianjur, Purwakarta, Banyuwangi, Palembang, Bengkulu dan Lampung, yang sebagian besar telah dilakukan vaksinasi AI, kecuali virus A/Duck/Banten/Tng19/2010, dan A/Duck/Banten/Tng19/2010 yang berasal dari itik dan virus A/Ck/West Java/Smi-Zae/2010 yang berasal dari wabah ayam kampung. Sebelas isolat virus ini kemudian dianalisis lebih lanjut untuk mengetahui perubahan/ mutasi dan karakter genetiknya.

### **Karakter Genetika Virus AI tahun 2010 pada Protein HA**

Hasil analisis genetika sebelas virus yang berhasil diisolasi pada gen HA1 memperlihatkan bahwa analisis asam amino pada daerah *cleavage site* gen HA merupakan asam amino S pada posisi -6 gen HA yang juga dimiliki oleh sebagian virus AI yang berasal dari unggas dan manusia tahun 2005-2009

**Tabel 1.** Nama isolat AI yang diisolasi pada tahun 2010 dan sejarah vaksinasi.

No	Asal Sampel	Gejala Klinis	Sejarah Vaksinasi	Nama Isolat yang berhasil diisolasi
1	Sukabumi	Mortalitas tinggi	Tidak vaksinasi	A/Ck/West Java/Smi-Zae/2010
2	Cianjur	Tidak ada	Vaksinasi	A/Ck/West Java/Cjr45/2010
3	Purwakarta	Tidak ada	Vaksinasi	A/Ck/West Java/PwtD10-39/2010
4	Bandung	Tidak ada	Vaksinasi	A/Ck/West Java/Bdg2/2010
5	Bandung	Tidak ada	Vaksinasi	A/Ck/West Java/Bdg8/2010
6	Tangerang	Tidak ada	Tidak vaksinasi	A/Ck/Banten/Tng11/2010
7	Tangerang	Tidak ada	Tidak vaksinasi	A/Ck/Banten/Tng19/2010
8	Palembang	Mortalitas tinggi	Vaksinasi	A/Ck/South Sumatra/Plbg/2010
9	Lampung	Mortalitas tinggi	Vaksinasi	A/Ck/Lampung/Ahk/2010
10	Banyuwangi	Mortalitas tinggi	Vaksinasi	A/Ck/East Java/Bwi-I2/2010
11	Bengkulu	Mortalitas tinggi	Vaksinasi	A/Ck/Bengkulu/Bkl/2010

(Dharmayanti 2009; Dharmayanti *et al.* 2010). Sebagian besar virus AI tahun 2010 mempunyai sebanyak 4 tempat glikosilasi pada protein HA1, dan tidak mempunyai tempat glikosilasi pada posisi 84, 165 dan 193 (Gambar 1). Hanya satu virus yaitu A/Chicken/West Java/Smi-Zae/2010, yang mempunyai tujuh tempat glikosilasi.

Analisis genetika pada protein HA1 memperlihatkan bahwa sebagian besar virus AI tahun 2010 mempunyai mutasi asam amino yang dimiliki oleh virus AI yang diisolasi dari ayam yang divaksinasi AI tahun 2006-2008, dan sangat mirip dengan virus A/Ck/West Java/Pwt-Wij/06 dan A/Ck/West Java/Smi-Pat/06. Virus-virus tersebut adalah A/Ck/West Java/Bdg8/2010, A/Ck/West Java/Cjr45/2010, A/Ck/West Java/PwtD10-39/2010, A/Duck/Banten/Tng11/2010, A/East Java/BwiI2/2010, A/Ck/ South Sumatra/Plbg/2010, A/Ck/Lampung/Ahk/2010, A/Ck/Bengkulu/Bkl/2010. Persamaan

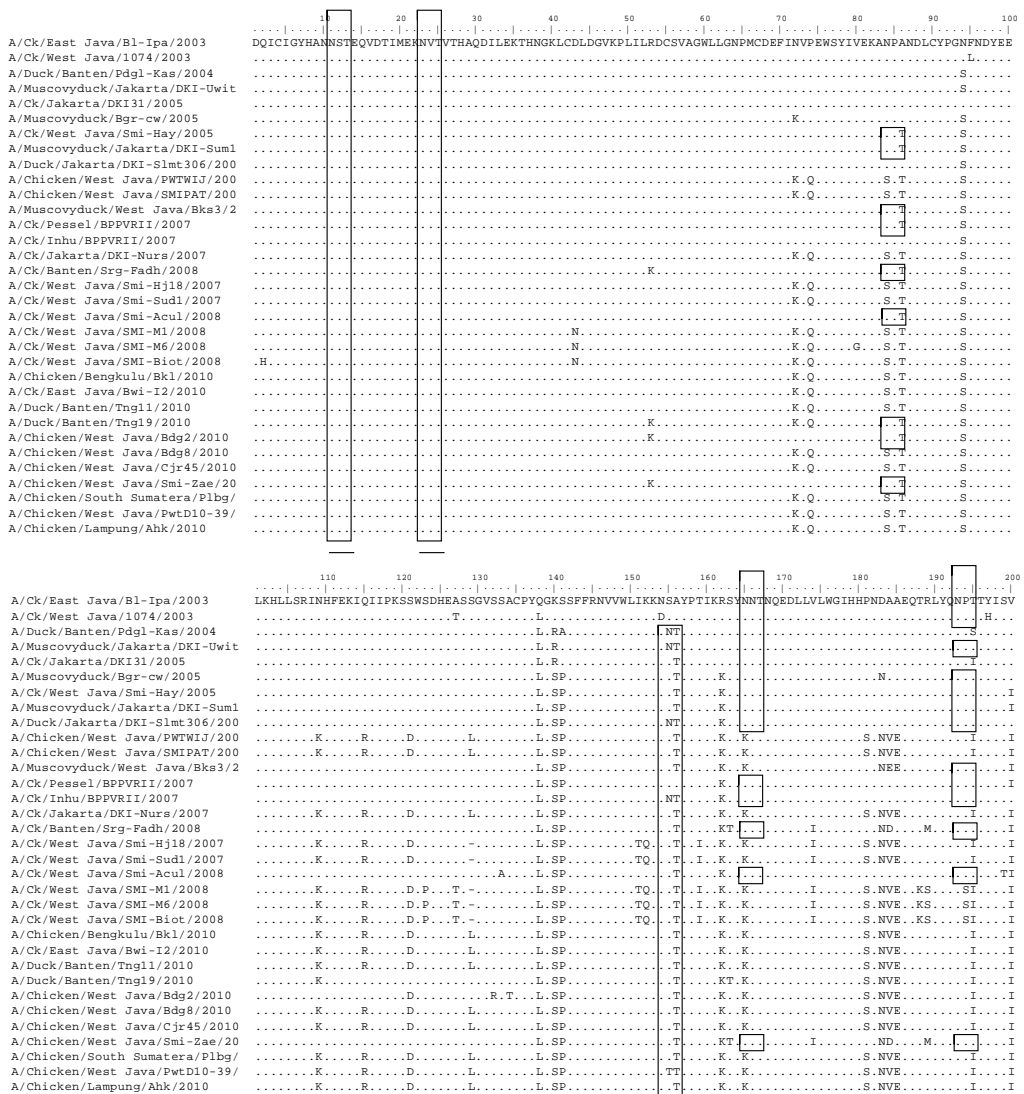
tersebut adalah mutasi pada posisi N72K, P74Q, N84S, A86T, N109K, Q115R, S121D, S129L, N165K, P181S, D183N, A184V, A185E, T195I, N220H, E227D, P235N, I239T dan N273D (Lihat Gambar 1). Isolat A/Duck/Banten/Tng19/2010 pada posisi 115, 121 dan 129 tidak menunjukkan mutasi, sehingga isolat A/Duck/Banten/Tng19/2010 hanya memiliki 16 motif substitusi sedangkan isolat A/West Java/Bdg2/2010 tidak mengalami substitusi pada posisi 109, 115 dan 129. Dari hasil analisis pada protein HA1, hanya satu isolat yaitu A/Ck/West Java/Smi-Zae/2010 yang menunjukkan kemiripan dengan isolat tahun 2008 yang diisolasi dari ayam kampung (A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008 dan A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008).

Motif mutasi pada virus /Ck/West Java/Bdg8/2010, A/Ck/West Java/Cjr45/2010, A/Ck/West Java/PwtD10-39/2010, A/Duck/Banten/Tng11/2010, A/East Java/BwiI2/2010, A/ South Sumatra/

**Sirkulasi virus Avian influenza H5N1 Tahun 2010 :**

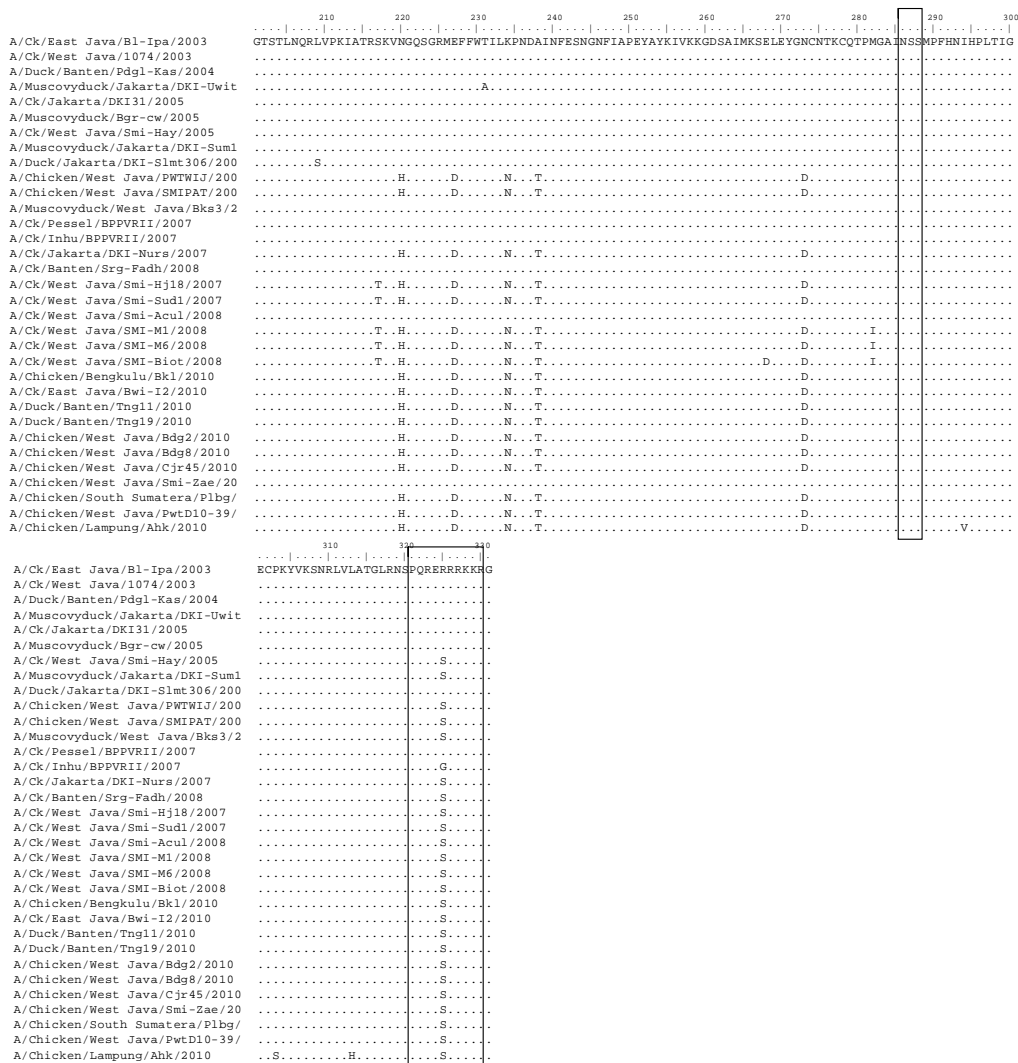
Plbg/2010, A/Ck/Lampung/Ahk/2010, A/Ck/Bengkulu/Bkl/2010 sesuai dengan motif yang telah ditemukan oleh Dharmayanti (2009) yang menyebutkan bahwa setidaknya terdapat 18-19

substitusi asam amino spesifik yang dimiliki oleh virus AI yang diisolasi dari ayam yang divaksinasi AI. Pada Gambar 1 terlihat adanya substitusi tersebut yang serupa dengan virus A/Ck/West Java/



**Gambar 1.** *Multiple alignment* protein HA1 virus AI sub tipe H5N1 tahun 2003-2010. Tempat glikosilasi ditandai dengan kotak kecil, sedangkan kotak besar merupakan daerah *cleavage site* gen HA.

## Dharmayanti *dkk.*



**Gambar 1.** Lanjutan

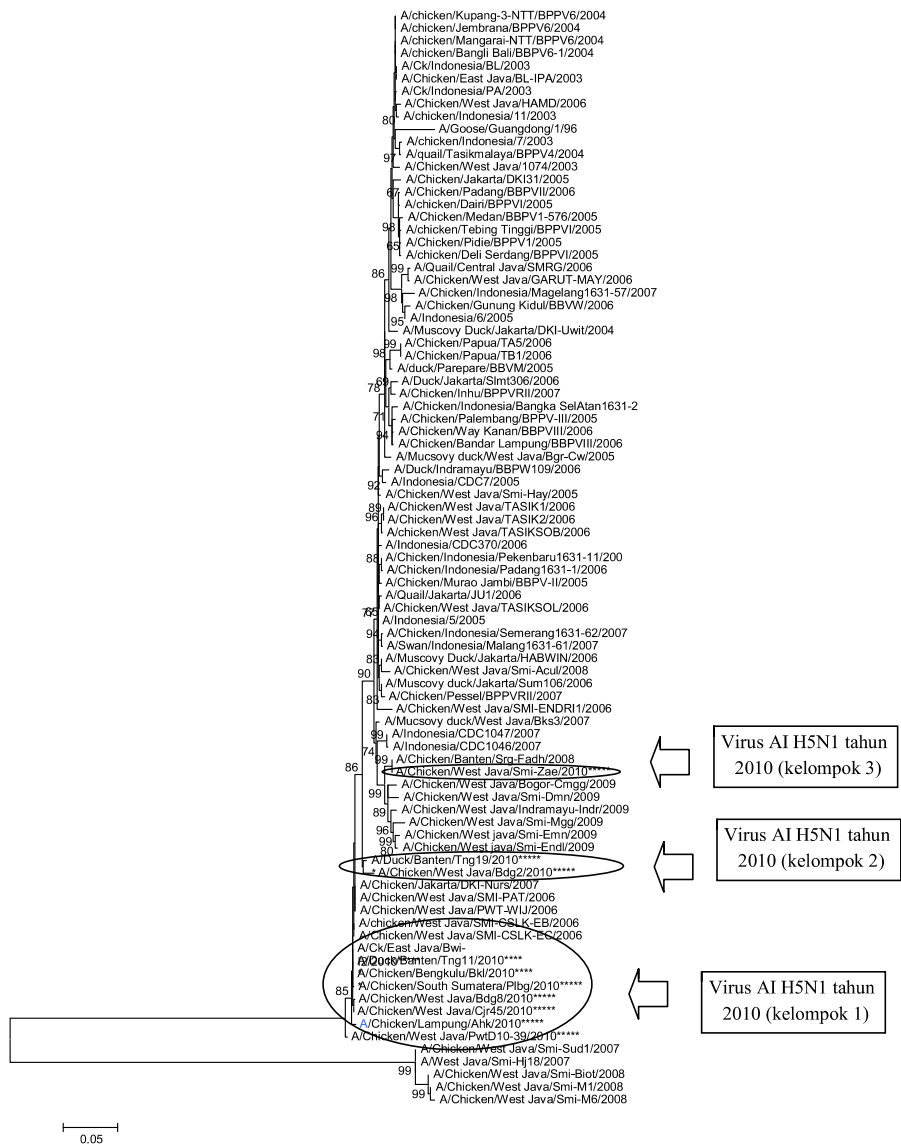
Pwt-Wij/06 dan A/Ck/West Java/Smi-Pat/06.

Analisis filogenetik menunjukkan bahwa virus AI yang diisolasi pada tahun 2010 yang berasal dari unggas yang divaksinasi AI mempunyai kelompok yang sama dengan virus anti genik drift tahun 2006 termasuk virus A/Ck/West

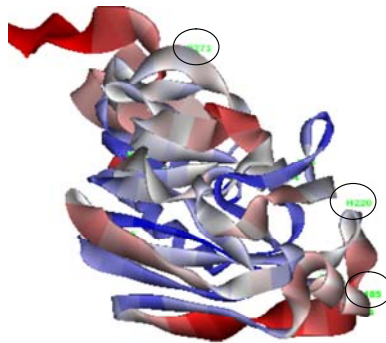
Java/Pwt-Wij/2006) dan berbeda kelompok dengan virus anti genik drift tahun 2007-2008 (Gambar 2).

Visualisasi tiga dimensi protein HA (Gambar 3), dari 19 substitusi asam amino menunjukkan hanya asam amino pada posisi 183, 185, 220, 273 yang tampak terekspos pada permukaan

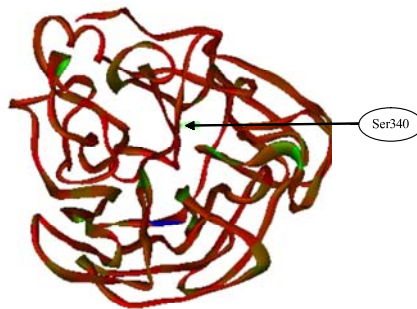
## Sirkulasi virus Avian influenza H5N1 Tahun 2010 :



**Gambar 2.** Filogenetik virus AI sub tipe H5N1 pada aras gen HA1. Virus yang digunakan pada penelitian ini ditandai dengan tanda bintang dalam lingkaran. Virus AI tahun 2010 pada pohon filogenetika terbagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok 3 terdiri dari virus AI yang tidak mengalami *genetic drift*, kelompok 2 dan kelompok 1 merupakan kelompok virus yang mengalami *genetic drift*.



**Gambar 3.** Visualisasi prediksi 3 Dimensi protein HA virus A/Chicken.East Java/Bwi-I2/2010. Asam amino yang dilingkari adalah contoh dari mutasi asam amino yang terjadi pada permukaan molekul HA.



**Gambar 4.** Visualisasi prediksi 3 Dimensi protein NA virus A/Chicken.East Java/Bwi-I2/2010. Asam amino yang dilingkari adalah satu-satunya mutasi asam amino yang terjadi pada protein NA dan tidak terekspos pada permukaan protein.

molekul protein HA yang serupa dengan virus A/Ck/West Java/Pwt-Wij/2006. Visualisasi tiga dimensi protein HA (Gambar 3), dari 19 substitusi asam amino menunjukkan hanya asam amino pada posisi 183, 185, 220, 273 yang tampak terekspos pada permukaan molekul protein HA yang serupa dengan virus A/Ck/West Java/Pwt-Wij/2006.

#### **Karakter Genetika Virus AI tahun 2010 pada Protein NA**

Analisis pada protein NA memperlihatkan bahwa virus AI tahun

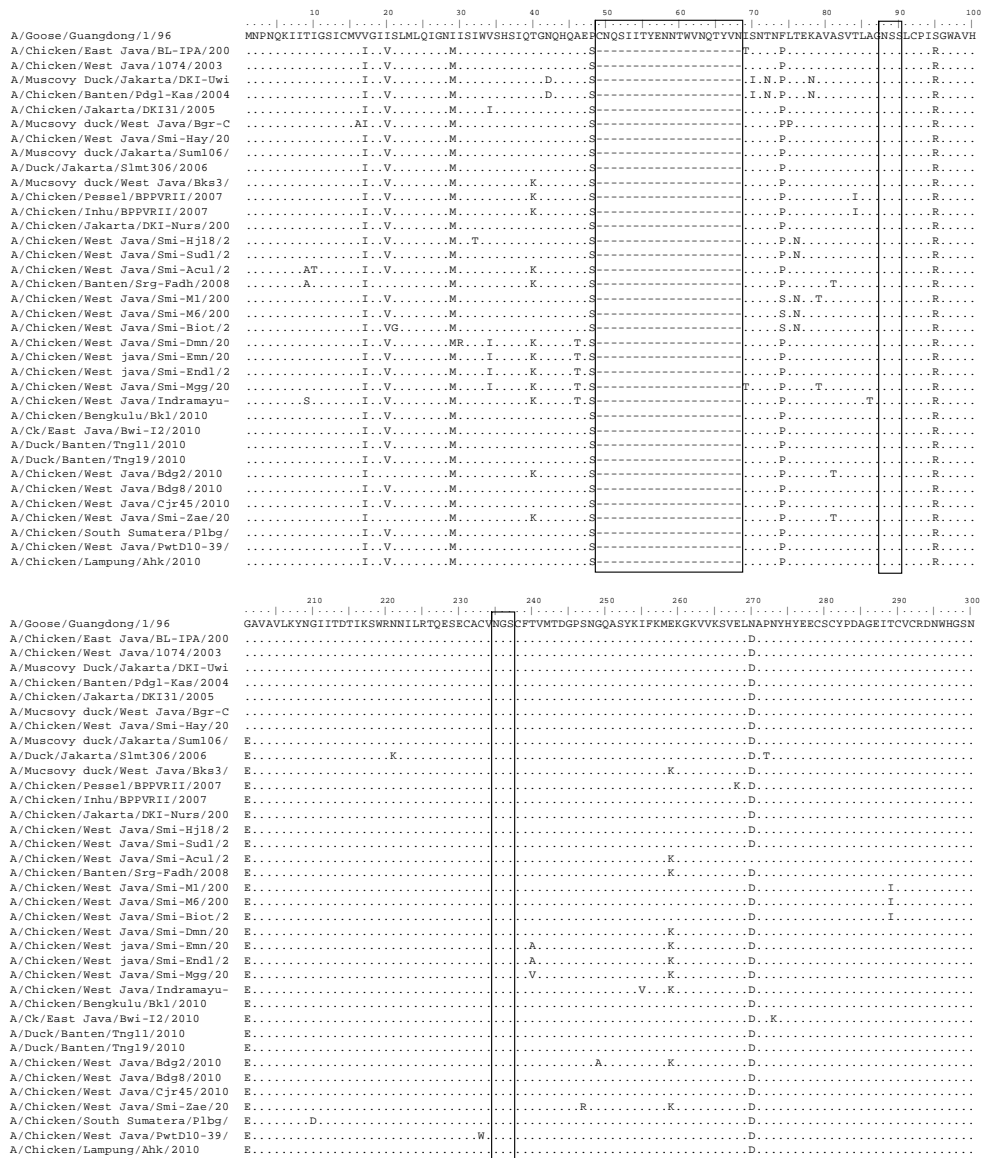
2010, seperti virus AI asal Indonesia lainnya mempunyai 20 *stalk* asam amino pada protein NA pada posisi 48-67. Ini berarti virus AI 2010, seperti virus AI asal Indonesia lainnya hanya memiliki tiga tempat glikosilasi, yaitu posisi 88, 146 dan 235. *Multiple alignment* protein NA menunjukkan bahwa virus AI 2010 yaitu A/Ck/West Java/Smi-Zae/2010 dan A/Ck/West Java/Bdg2/2010 mengalami perubahan asam amino pada posisi 40 yaitu K menggantikan T (T40K). Selain itu, mutasi juga terjadi pada posisi 189 yaitu asam amino S digantikan oleh G



## Sirkulasi virus Avian influenza H5N1 Tahun 2010 :

(S189G), asam amino E digantikan oleh asam amino K pada posisi 259 (E259K), dan asam amino G menggantikan E

(G382E) (Gambar 3). Tiga mutasi ini serupa dengan virus AI tahun 2008 dan 2009 yang diisolasi dari ayam buras



**Gambar 5.** Multiple alignment protein NA virus AI subtype H5N1 tahun 2003-2010. Sekuen asam amino dalam kotak besar adalah 20 *stalk* asam amino pada semua virus AI H5N1 asal Indonesia. Kotak kecil menunjukkan lokasi tempat glikosilasi protein NA. Asam amino dalam lingkaran merupakan mutasi yang terjadi pada sebagian besar virus AI tahun 2010. Ringkasan mutasi dan tempat glikosilasi dapat dilihat pada Tabel 2.

## Dharmayanti *dkk.*

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
A/Goose/Guangdong/1/96	G	A	V	A	L	K	Y	N	G	I
A/Chicken/East Java/BL-TPA/200	T	D	T	I	K	S	W	R	N	I
A/Chicken/West Java/1074/2003	L	R	T	Q	S	S	C	A	C	V
A/Muscovy Duck/Jakarta/DKI-Uwi	G	S	C	T	T	V	M	T	D	G
A/Chicken/Banten/Pdgl-Kas/2004	P	S	N	G	Q	A	S	Y	K	I
A/Chicken/Jakarta/DKI31/2005	F	K	M	E	K	G	V	V	K	S
A/Muscovy duck/West Java/Bgr-C	V	E	L	N	A	P	N	H	Y	E
A/Chicken/West Java/Smi-Hay/20	E	C	S	Y	P	D	A	G	I	T
A/Muscovy duck/Jakarta/Sum106/	C	V	C	R	N	H	G	S		
A/Duck/Jakarta/Slmt306/2006										
A/Muscovy duck/West Java/Bks3/										
A/Chicken/Pessel/BPPVRII/2007										
A/Chicken/Inhu/BPPVRII/2007										
A/Chicken/Jakarta/DKI-Nurs/200										
A/Chicken/West Java/Smi-Hj18/2										
A/Chicken/West Java/Smi-Sud1/2										
A/Chicken/West Java/Smi-Acul/2										
A/Chicken/Banten/Srg-Padh/2008										
A/Chicken/West Java/Smi-M1/200										
A/Chicken/West Java/Smi-M6/200										
A/Chicken/West Java/Smi-Biot/2										
A/Chicken/West Java/Smi-Dmn/20										
A/Chicken/West Java/Smi-Emn/20										
A/Chicken/West Java/Smi-End1/2										
A/Chicken/West Java/Smi-Mgg/20										
A/Chicken/West Java/Indramayu-										
A/Chicken/Bengkulu/Bk1/2010										
A/Ck/East Java/Bw1-I2/2010										
A/Duck/Banten/Tng11/2010										
A/Duck/Banten/Tng19/2010										
A/Chicken/West Java/Bdg2/2010										
A/Chicken/West Java/Bdg8/2010										
A/Chicken/West Java/Cj45/2010										
A/Chicken/West Java/Smi-Zae/20										
A/Chicken/South Sumatera/Plbg/										
A/Chicken/West Java/PwtD10-39/										
A/Goose/Guangdong/1/96										
A/Chicken/East Java/BL-TPA/200										
A/Chicken/West Java/1074/2003										
A/Muscovy Duck/Jakarta/DKI-Uwi										
A/Chicken/Banten/Pdgl-Kas/2004										
A/Chicken/Jakarta/DKI31/2005										
A/Muscovy duck/West Java/Bgr-C										
A/Chicken/West Java/Smi-Hay/20										
A/Muscovy duck/Jakarta/Sum106/										
A/Duck/Jakarta/Slmt3/2006										
A/Muscovy duck/West Java/Bks3/										
A/Chicken/Pessel/BPPVRII/2007										
A/Chicken/Inhu/BPPVRII/2007										
A/Chicken/Jakarta/DKI-Nurs/200										
A/Chicken/West Java/Smi-Hj18/2										
A/Chicken/West Java/Smi-Sud1/2										
A/Chicken/West Java/Smi-Acul/2										
A/Chicken/Banten/Srg-Padh/2008										
A/Chicken/West Java/Smi-M1/200										
A/Chicken/West Java/Smi-M6/200										
A/Chicken/West Java/Smi-Biot/2										
A/Chicken/West Java/Smi-Dmn/20										
A/Chicken/West Java/Smi-Emn/20										
A/Chicken/West Java/Smi-End1/2										
A/Chicken/West Java/Smi-Mgg/20										
A/Chicken/West Java/Indramayu-										
A/Chicken/Bengkulu/Bk1/2010										
A/Ck/East Java/Bw1-I2/2010										
A/Duck/Banten/Tng11/2010										
A/Duck/Banten/Tng19/2010										
A/Chicken/West Java/Bdg2/2010										
A/Chicken/West Java/Bdg8/2010										
A/Chicken/West Java/Cj45/2010										
A/Chicken/West Java/Smi-Zae/20										
A/Chicken/South Sumatera/Plbg/										
A/Chicken/West Java/PwtD10-39/										

## Gambar 5. Lanjutan

tanpa vaksinasi AI. Virus AI tahun 2010 lainnya terutama yang diisolasi dari unggas yang divaksinasi AI, hanya mempunyai perubahan asam amino pada posisi 340 yaitu (P $\ddot{Y}$  S) (Tabel 2), sehingga tidak memiliki perubahan di

urutan asam aminonya pada level protein NA.

Perubahan asam amino pada sebagian besar isolat virus 2010 dalam penelitian ini divisualisasikan pada gambar prediksi 3 dimensi protein HA yaitu (P340S) terletak terbenam dan tidak

## Sirkulasi virus Avian influenza H5N1 Tahun 2010 :

	410	420	430	440	450	460
A/Goose/Guangdong/1/96	G	Y	S	G	S	F
A/Chicken/East Java/BL-IPA/200	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/West Java/1074/2003	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Muscovy Duck/Jakarta/DKI-Uwi	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/Banten/Pdgl-Kas/2004	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/Jakarta/DKI31/2005	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Muscovy duck/West Java/Bgr-C	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/West Java/Smi-Hay/20	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Muscovy duck/Jakarta/Sum106/	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Duck/Jakarta/Slmt306/2006	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Muscovy duck/West Java/Bks3/	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/Pessel/BPPVR11/2007	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/Inhu/BPPVR11/2007	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/Jakarta/DKI-Nurs/200	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/West Java/Smi-Hj18/2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/West Java/Smi-Sud1/2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/West Java/Smi-Acul/2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/Banten/Srg-Padgh/2008	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/West Java/Smi-M1/200	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/West Java/Smi-M6/200	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/West Java/Smi-Biot/2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/West Java/Smi-Dmn/20	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/West Java/Smi-Emn/20	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/West Java/Smi-End1/2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/West Java/Smi-Mgg/20	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/West Java/Indramayu-	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/Bengkulu/Bkl/2010	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Ck/East Java/Bwi-12/2010	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Duck/Banten/Tng11/2010	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Duck/Banten/Tng19/2010	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/West Java/Bdg2/2010	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/West Java/Bdg8/2010	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/West Java/Cjr45/2010	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/West Java/Smi-Zae/20	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/South Sumatera/Plbg/	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A/Chicken/West Java/PwtD10-39/	.....	.....	.....	.....	.....	.....

**Gambar 5.** Lanjutan

berada pada permukaan molekul NA, sehingga mutasi yang terjadi kemungkinan tidak menimbulkan perubahan pada *binding site* atau protein aktif NA.

Hasil analisis filogenetik gen NA menunjukkan virus 2010 yang diisolasi dari unggas yang divaksinasi AI masih belum bermutasi karena masih dalam satu kelompok besar virus AI asal Indonesia lainnya, meskipun tidak berdekatan dengan virus yang berasal dari unggas yang tidak divaksin AI. (Gambar 6).

## PEMBAHASAN

Protein HA virus influenza mempunyai glikoprotein trimerik yang mempunyai 3-9 *N-linked glycosylation sequons* perunit, tergantung pada galur

virus (Schulze 1997). Hasil penelitian ini sesuai dengan Dharmayanti (2009) yang menyatakan bahwa virus asal unggas yang divaksinasi hanya memiliki sebanyak 4 tempat glikosilasi pada HA1 dan satu glikosilasi HA2. Dalam analisis filogenetik virus-virus *genetic drift* dalam penelitian ini memiliki kekerabatan yang sangat dekat dengan virus A/Ck/West Java/Pwt-Wij/2006. Mutasi yang dimiliki oleh virus AI tahun 2010 ini juga menunjukkan kemiripan dengan virus A/Ck/West Java/Pwt-Wij/2006.

Mutasi termasuk substitusi asam amino, tidak semua bermakna dan akan mempengaruhi pengenalan antibodi, perubahan *binding site* atau yang lainnya, karena sebagian besar asam amino terbenam/tidak terekspos pada permukaan molekul yang akan berinteraksi dengan lingkungannya. Dari

**Tabel 2.** Sekuen asam amino pada protein NA, mutasi, stalk asam amino dan tempat glikosilasi virus AI tahun 2010 yang digunakan pada penelitian ini

Virus	Stalk asam amino	Tempat glikosilasi			Mutasi asam amino				
		88	146	235	40	163	189	340	382
Virus AI tahun 2009	√	√	√	√	√	√	√		√
Virus AI asal unggas yang divaksinasi (2006-2008)	√	√	√	√	–	–	–	√	–
A/Ck/West Java/Smi-Zae/2010	√	√	√	√	–	–	√	–	√
A/Ck/West Java/Cjr45/2010	√	√	√	√	–	–	–	√	–
A/Ck/West Java/PwtD10-39/2010	√	√	√	√	–	–	–	√	–
A/Ck/West Java/Bdg2/2010	√	√	√	√	–	–	√	–	√
A/Ck/West Java/Bdg8/2010	√	√	√	√	–	–	–	√	–
A/Ck/Banten/Tng11/2010	√	√	√	√	–	–	–	√	–
A/Ck/Banten/Tng19/2010	√	√	√	√	–	–	–	√	–
A/Ck/South Sumatra/Plbg/2010	√	√	√	√	–	–	–	√	–
A/Ck/Lampung/Ahk/2010	√	√	√	√	–	–	–	√	–
A/Ck/East Java/Bwi-I2/2010	√	√	√	√	–	–	–	√	–
A/Ck/Bengkulu/Bkl/2010	√	√	√	√	–	–	–	√	–

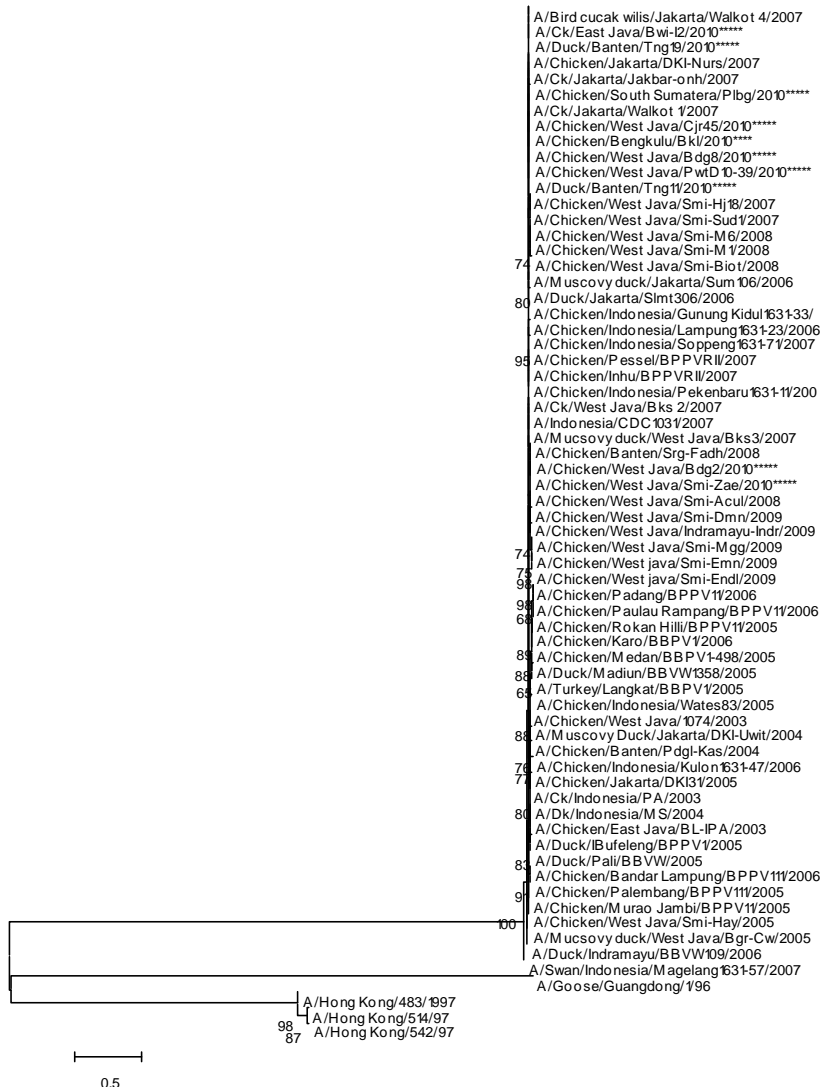
hasil visualisasi permukaan globular protein HA akan diketahui posisi asam amino yang terekspos dan pada permukaan molekul akan berperan penting dalam memprediksi adanya mutasi yang akan mempengaruhi binding dari antigen atau senyawa lainnya. Dalam penelitian ini, mutasi terjadi

diantaranya pada asam amino pada posisi 185 yaitu asam amino Alanin (A) yang merupakan asam amino kurang polar disubstitusi oleh asam amino polar bermuatan negatif yaitu Glutamat (E). Alanin pada virus BL-IPA/03 merupakan asam amino yang tidak reaktif dan jarang terlibat langsung dalam

## Sirkulasi virus Avian influenza H5N1 Tahun 2010 :

fungsi protein. Pada sebagian besar virus AI tahun 2010, pada posisi ini digantikan oleh asam amino Glutamat yang umumnya terekspos pada permukaan molekul pada epitop A dan jika berpasangan dengan asam amino

bermuatan positif akan membentuk ikatan hidrogen yang penting untuk stabilitas protein. Substitusi ini bermakna, karena kemungkinan akan menimbulkan perubahan pada pengenalan antibodi.



**Gambar 6.** Pohon filogenetik virus AI subtype H5N1 pada aras gen NA. Virus yang digunakan pada penelitian ditandai dengan tanda bintang.

Substitusi pada permukaan molekul lainnya adalah asam amino Asparagin (N) pada posisi 220 merupakan asam amino polar digantikan oleh asam amino polar Histidin (H) yang perannya sama yaitu berfungsi sebagai protein aktif atau *binding sites*, sedangkan asam amino pada posisi 273, asam amino Asparagin (N) disubstitusi dengan senyawa serupa yaitu asam amino Aspartat (D) bermuatan negatif dan berperan sebagai protein aktif atau *binding sites*. Substitusi ini serupa dengan asam amino pada epitop A *globular head* protein HA yaitu asam amino pada posisi 183 (Aspartat, D digantikan Asparagin, N), sehingga peran dan fungsi asam amino ini meskipun telah terjadi mutasi pada virus AI tahun 2010, kemungkinan tidak mempengaruhi *binding site* atau protein aktif pada posisi-posisi ini. Hal ini disebabkan karena, meskipun virus melakukan mutasi, virus akan tetap mempertahankan stabilitas proteinnya dalam upaya untuk dapat tetap bertahan hidup, karena mutasi yang berlebihan akan bisa mengakibatkan letal.

Ditemukannya virus AI subtipe H5N1 yang telah mengalami *antigenic drift* pada virus yang diisolasi dari peternakan yang melakukan vaksinasi AI heterolog sepanjang tahun 2006-2008 (Dharmayanti 2009) dan hasil penelitian lainnya mengubah kebijakan pemerintah untuk melakukan evaluasi penggunaan vaksin heterolog untuk mengendalikan penyakit AI pada unggas. Penggunaan vaksin dengan seed vaksin dari virus mutan A/Ck/West Java/Pwt-Wij/06 telah dimulai sejak tahun 2009 dan tersebar penggunaannya di wilayah Indonesia.

Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa virus dengan karakter genetik seperti A/Ck/West Java/Pwt-Wij/06 tidak hanya ditemukan di wilayah Jawa Barat yang merupakan asal dari virus ini, namun juga di daerah Palembang, Bengkulu, Lampung dan Jawa Timur. Penyebaran dan ditemukannya virus drift seperti virus A/Ck/West Java/Pwt-Wij/06 menunjukkan bahwa virus AI telah bermutasi cukup signifikan. Namun demikian sepanjang tahun 2010 tidak ditemukan virus *drift* seperti virus A/Ck/West Java/Smi-M6/2008 yang ditemukan pada tahun 2008 dan diketahui sangat patogen serta berbeda dengan virus *drift* A/Ck/West Java/Pwt-Wij/06 (Dharmayanti 2009).

*Genetic drift* virus avian influenza merupakan mekanisme mutasi random yang kemudian menjadi dominan dikarenakan seleksi atau adaptasi termasuk tekanan akibat vaksinasi. Protein HA adalah satu dari determinan utama dari virulensi virus di unggas dan target primer dari antibodi netralisasi yang dihasilkan akibat tekanan vaksinasi atau infeksi alam (Arafa *et al.* 2010). Hasil penelitian menunjukkan bahwa virus AI tahun 2010 yang berasal dari unggas yang divaksinasi AI mengalami mutasi yang signifikan di level protein HA, namun tidak di protein NA. Hal ini sesuai dengan yang ditemukan Dharmayanti (2009) yang menyatakan bahwa virus AI menerima tekanan seleksi positif pada gen HA dan tidak pada gen NA. Data hasil penelitian ini dan data penelitian Dharmayanti *et al.* (2010) memperlihatkan bahwa isolat AI asal unggas yang tidak divaksinasi AI mengalami mutasi spesifik pada protein NA. Hal ini sangat

menarik, meskipun pada dasarnya virus tetap terus bermutasi, namun fenomena mutasi antara virus dengan latar belakang yang berbeda menunjukkan hal yang berbeda juga.

Penggunaan vaksin AI yang cukup intensif di peternakan komersial kemungkinan menginduksi adanya virus AI yang mengalami *genetic drift*. Disamping itu sejak tahun 2009 telah diproduksi dan digunakannya vaksin yang salah satunya menggunakan A/Ck/West Java/Pwt-Wij/06 kemungkinan menyebabkan semakin meluasnya virus AI yang mempunyai karakter genetik seperti A/Ck/West Java/Pwt-Wij/06 di Indonesia. Dua hal tersebut diatas, kemungkinan merupakan penyebab telah meluasnya virus AI drift yang dua tahun yang lalu dinyatakan hanya terdapat di Purwakarta atau daerah Jawa Barat saja. Keamanan penggunaan vaksin 'whole virus' sebagai *seed* vaksin mungkin harus dievaluasi atau menggunakan alternatif penggunaan *seed* vaksin yang lebih aman seperti penggunaan vaksin dengan menggunakan teknologi rekayasa genetik (*reverse genetic*, *virus-like particles*, rekombinan).

## KESIMPULAN

Sebagian besar virus AI subtipe H5N1 yang diisolasi sepanjang tahun 2010 menunjukkan mutasi yang serupa dengan virus *genetic drift* tahun 2006 yaitu A/Ck/West Java/Pwt-Wij/2006. Virus-virus ditandai dengan adanya substitusi 18-19 asam amino pada aras protein HA. Pemetaan genetika virus AI subtipe H5N1 tahun 2010

memperlihatkan bahwa penyebaran virus *genetic drift* telah meluas karena bukan hanya ditemukan di daerah Jawa Barat tetapi telah ditemukan di Pulau Sumatra, Banten, Jawa Barat dan Jawa Timur. Menyebarnya virus *genetic drift* ini belum diketahui pasti, kemungkinan akibat tekanan vaksinasi atau telah meluasnya penggunaan vaksin yang menggunakan seed vaksin A/West Java/Pwt-Wij/2006.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arafa, A., DA. Suarez, MK. Hassan & MM. Aly. 2010. Phylogenetic analysis of hemagglutinin and neuraminidase genes of highly pathogenic avian influenza H5N1 Egyptian strains isolated from 2006 to 2008 indicates heterogeneity with multiple distinct sublineages. *Avian Dis.* 54 : 345-349.
- Dharmayanti, NLP I., R. Damayanti, A. Wiyono, R. Indriani, & Darminto. 2004. Identifikasi virus avian influenza virus isolat Indonesia dengan metode reverse transcriptase polymerase chain reaction RT-PCR. *JITV.* 9. 2 : 136-143.
- Dharmayanti, NLP I. 2009. Perubahan Genoma Virus Avian Influenza subtipe H5N1 pada unggas di Indonesia. [Disertasi]. Jakarta : Universitas Indoensia.
- Dharmayanti, NLP I., DA. Hewajuli, A. Ratnawati, R. Indriani & Darminto. 2010. Karakter Genetik Protein Membran Virus Avian Influenza subtype H5N1. *JITV.* 15.3 : 231-239

- Dharmayanti, NLP I & Darminto. 2009. Mutasi Virus AI di Indonesia : Antigenic Drift Protein Hemagglutinin (HA) Virus Influenza H5N1 Tahun 2003-2006. *MKH*. 25. 1 : 1-8.
- Dharmayanti, NLP., R. Indriani, R. Hartawan, DA. Hewajuli, A. Ratnawati & Darminto. 2008. Pemetaan Genetik Virus Avian Influenza di Indonesia 2007. *J. Biol. Indon*. 5. 2 : 155-171.
- Dharmayanti, NLP I & R. Indriani. 2007. Patogenesis molekuler virus avian influenza (AI) di Jakarta, Banten dan Jawa Barat pada wabah AI tahun 2005. *MKH*. 23. 2 : 68-73.
- Dharmayanti, NLP I., R. Indriani & R.M.A Adjid. 2006. Identifikasi virus avian influenza pada beberapa jenis unggas di Taman Margastwa Ragunan dan upaya eradikasinya. *MKH*. 22. 2 : 79-83
- Dharmayanti, NLP I., R. Damayanti, R. Indriani, A. Wiyono & R.M.A. Adjid. 2005a. Karakterisasi molekuler virus avian influenza isolate Indonesia. *JITV*. 10. 2 : 127-133.
- Dharmayanti, NLP I., R. Damayanti, R. Indriani, A. Wiyono & R.M.A. Adjid. 2005b. Karakter virus avian influenza isolate Indonesia pada wabah gelombang kedua. *JITV*. 10.3 : 217-226
- Fouchier, RAM., TM. Bestebroer, S. Herfst., L. Van Der Kemp, GF.Rimmelzwaan. & ADME. Osterhaus. 2000. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J. Clin. Microbiol*. 38. 11 : 4096 – 4101.
- Hoffmann, E., J. Stech, Y. Guan, RG. Webster & DR. Perez. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol*. 146. 2275-2289.
- Hsu, SM., L. Raine & H. Franger. 1981. The use of avidin-biotin peroxidase complex in immunoperoxidase techniques. *Am. J. Clin. Pathol*. 75: 816-821.
- Lee, MS., PC.Chang, JH.Shien, MC. Cheng & HP.Shieh. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J. Virol. Methods*. 97. 13-22.
- Oie . 2000. Manual Of Standards for Diagnostik tests and vaccines. Pp 212 – 219.
- Perkins, LEL & DE. Swayne. 2003. Varied pathogenicity of a Hong Kong- origin H5N1 avian influenza virus in four passerine species and budgerigars. *Vet. Pathol* 40: 14-24
- Guan, Y., LL.M Poon, CY. Cheung, TM. Ellis, W. Lim, AS. Lipatov, K.H. Chan., KM. Strum-Ramirez, CL.Cheung, YHC. Leung, KY. Yuen, RG Webster & JSM . Peiris. 2004. H5N1 influenza: A protean pandemic threat. *PNAS*. 102. 21: 8156-8161.
- Li, KS., Y. Guan, J. Wang, GJD. Smith, KM. Xu, L. Duan, AP. Ronohardjo, P. Puthavathana., C. Buranathai, TD. Nguyen, AT. Estoepangestie, A. Chaisingh, P.



- Auewarakul, HT. Long, NT. Hanh, RJ. Webby, LLM. Poon, H. Chen, KF. Shortridge, KY. Yuen, RG. Webster & JSM. Peiris. 2004. Genesis of highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*. 340: 209-213.
- Puthavathana, P., P. Auewarakul, PC. Charoenying, K. Sangsiriwut, P. Pooruk, K. Boonnak, R. Khanyok, P. Thawachsupa, R. Kijphati & P. Sawanpanyalert. 2005. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J. Gen Virol*. 86 : 423-433.
- Schulze, IT. 1997. Effect of glycosilation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin. *J Infect Dis*. 176 : S24-8.
- Wiyono, A., R. Indriani, NLP I. Dharmayanti, R. Damayanti & Darminto. 2004. Isolasi dan Karakterisasi Virus Highly Pathogenic Avian Influenza subtype H5 dari ayam asal Wabah di Indonesia. *JITV*. 9.1 : 61-71.
- World Health Organization, 2005. Global influenza program surveillance network, 2005. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. *Emerging Infect.Dis*. 11.1515-1521.
- Wright, KE., GAR Wilson, D. Novosad, C. Dimock, D. Tan & JM. Weber. 1995. Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. *J. Clin. Microbiol*. 33:1180-1184.
- Memasukkan:** Agustus 2011  
**Diterima:** Desember 2011